การศึกษาเปรียบเทียบการแช่แข็งอสุจิแบบเนื้อแก้วโดยเทคนิค Solid surface vitrification ในน้ำยาแช่แข็งอสุจิ 3 ชนิด

Solid surface vitrification of human spermatozoa: Comparision of three cryoprotectants

จิรัฐติกาล ไชยา[1]

Jirattikan Chaiya[1]

บทคัดย่อ

การศึกษานี้ต้องการเปรียบเทียบน้ำยาแช่แข็งที่มีส่วนประกอบของ Cryoprotectant ที่แตกต่างกันเพื่อพิจารณาว่าน้ำยาชนิดใดให้ผลการแช่แข็งอสุจิดีที่สุดและลดการตายของอสุจิได้มากที่สุด อาสาสมัครชาย 47 คน ที่มีน้ำอสุจิปกติ เมื่อได้น้ำอสุจิจากอาสาสมัคร1คน จะนำไปคัดแยกอสุจิโดยเทคนิค Discontinuous density gradient แล้วนำอสุจิแบ่งออกเป็น 4 กลุ่มเท่าๆกัน คือ กลุ่มที่ 1: กลุ่มอสุจิก่อนการแช่แข็ง(Pre-freeze), กลุ่มที่2 : กลุ่มอสุจิที่แช่แข็งด้วยน้ำยา Glycerol egg yolk citrate (GEYC), กลุ่มที่3 : กลุ่มอสุจิที่แช่แข็งด้วยน้ำยา Glycerol citrate buffer (GC) และกลุ่มที่4 : กลุ่มอสุจิที่แช่แข็งด้วยน้ำยา Human sperm preservation medium (HSPM) เมื่อแช่แข็งและละลายอสุจิแล้วนำอสุจิที่ได้มาตรวจวิเคราะห์เปรียบเทียบคุณภาพอสุจิ (Semen analysis) เพื่อดูการเคลื่อนไหว, การเคลื่อนไหวไปข้างหน้า, อสุจิที่มีรูปร่างปกติ และอสุจิที่มีชีวิต

เมื่อเปรียบเทียบกลุ่มการทดลองกับกลุ่ม Pre-freeze พบว่าอัตราการเคลื่อนไหว, อัตราการเคลื่อนไหวไปข้างหน้า, อัตราอสุจิที่มีรูปร่างปกติ และอัตราอสุจิที่มีชีวิต มีค่าลดลงอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ แต่เมื่อเปรียบเทียบระหว่างกลุ่มทดลองนั้นพบว่ากลุ่มน้ำยา GEYC และ HSPM จะมีอัตราการเคลื่อนไหว, อัตราการเคลื่อนไหวไปข้างหน้าและอัตราอสุจิที่มีชีวิต มีค่าสูงกว่าอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติเมื่อเปรียบเทียบกับกลุ่ม GC และในส่วนของอัตราอสุจิที่มีรูปร่างปกติ พบว่ากลุ่มน้ำยา GEYC มีค่าสูงกว่ากลุ่มน้ำยา GC และ HSPM อย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ

การแช่แข็งในน้ำยา GEYC และ HSPM ให้อัตราการเคลื่อนไหว, อัตราการเคลื่อนไหวไปข้างหน้าและอัตราอสุจิที่มีชีวิตดีกว่าน้ำยา GC และการใช้ Egg yolk เป็นส่วนประกอบในน้ำยา GEYC ให้อัตราอสุจิที่มีรูปร่างปกติดีที่สุด กล่าวได้ว่าน้ำยา GEYC และ HSPM เหมาะสมสำหรับการแช่แข็งแบบเนื้อแก้วโดยเทคนิค Solid surface vitrification

คำสำคัญ: Cryoprotectant, Solid surface vitrification, Cryopreservation, Human sperm

[1] นักวิชาการวิทยาศาสตร์การแพทย์ ศูนย์รักษาผู้มีบุตรยาก โรงพยาบาลธรรมศาสตร์เฉลิมพระเกียรติ

Corresponding E-mail : cjirattikan@gmail.com

Abstract

The present study aims to compare effect of cryopreservation medium has components cryoprotectant to different whether the protective effects of semen cryopreservation and decrease sperm death.

Semen samples collected from 47 normospermic male volunteers. Semen were sperm prepared by Discontinuous density gradient technique and divided into 4 groups. Group 1: sperm preparation (Pre-freeze). Group 2: Sperm freezing with glycerol egg yolk citrate (GEYC). Group 3: Sperm freezing with glycerol citrate (GC). Group 4: Sperm freezing with Human sperm preservation medium (HSPM). The semen quality of these four groups were compere i.e. semen analysis for motility, progressive motility, normal sperm morphology and vitality.

Significantly decreased in motility, progressive motility, normal sperm morphology and vitality were found in experiment groups compared Pre-freeze group. On the other hand, GEYC and HSPM were motility, progressive motility and vitality increased significantly compared to GC. Furthermore, GEYC was normal sperm morphology increased significantly compared GC and HSPM.

Cryopreservation with GEYC medium and HSPM medium lead to increased motility, progressive motility and vitality compared GC medium. In GEYC medium is egg yolk component more than normal sperm morphology. Similarly, GEYC medium and HSPM medium appropriate for Solid surface vitrification.

Keywords: Cryoprotectant, Solid surface vitrification, Cryopreservation, Human sperm

บทนำ

การแช่แข็งอสุจิ (Sperm cryopreservation) เป็นเทคนิคในการเก็บรักษาอสุจิภายใต้สภาวะอุณหภูมิที่เย็นจัด (Ultra low temperature) เพื่อให้สามารถเก็บรักษาอสุจิได้เป็นระยะเวลานาน การแช่แข็งอสุจิจึงมีประโยชน์ทางการแพทย์และเทคโนโลยีช่วยการเจริญพันธุ์ ในกรณีฝ่ายชายที่รักษาด้วยรังสีหรือเคมีบำบัด(Sanger et al., 1992) การรักษาโรคมะเร็งอาจนำไปสู่ความเสียหายที่เกิดขึ้นในภาวะการเจริญพันธุ์หรือการเป็นหมัน เนื่องจากอวัยวะสืบพันธุ์หรือเซลล์สืบพันธุ์ได้รับความเสียหายอันเกิดจากการรักษา (Jensen et al., 2011) การแช่แข็งอสุจิจึงน่าจะเป็นวิธีการยืนยันได้ว่าคู่สามีภรรยาเหล่านี้ มีโอกาสที่จะมีบุตรได้ในอนาคต นอกจากนี้ยังมีบางโรคเช่น โรคเบาหวานและกลุ่มอาการที่มีการสร้างภูมิต้านทานต่อตนเอง (Autoimmune diseases) ที่อาจนำไปสู่ความเสียหายที่ลูกอัณฑะ การแช่แข็งจึงถูกแนะนำในการแก้ปัญหาเหล่านี้ (Anger et al., 2003) หรือในการผ่าตัดบางอย่างที่เกี่ยวข้องกับเส้นประสาทหรือเส้นเลือดที่มาควบคุมหรือมาเลี้ยงบริเวณอวัยวะสืบพันธุ์ชาย (Baumann et al., 2007) การแช่แข็งอสุจิก็มีความจำเป็นด้วยเช่นกัน

ในกระบวนการรักษาภาวะมีบุตรยาก กรณีที่คู่สามีภรรยาต้องใช้ไข่บริจาค เพื่อป้องกันการพบหรือรู้จักกันระหว่างผู้บริจาคไข่และผู้รับบริจาคไข่ รวมทั้งบางครั้งฝ่ายชายของคู่สามีภรรยาที่รับบริจาคไข่ไม่ต้องการที่จะมาเก็บน้ำอสุจิแบบที่มีเวลาเตรียมตัวน้อย (เจริญไชย เจียมจรรยา, 2554) ก็สามารถใช้วิธีเก็บน้ำอสุจิแช่แข็งไว้ก่อนที่จะเข้าสู่การรักษาด้วยกระบวนการทำเด็กหลอดแก้วหรือการผสมเทียม ในกรณีฝ่ายชายที่เป็น Azoospermia ต้องได้รับการเก็บอสุจิจากลูกอัณฑะหรือท่อ Epididymis (Donnelly et al., 2001) โดยวิธีศัลยกรรมไม่ว่าจะเป็นการใช้เข็มดูดอสุจิจากท่อพักน้ำเชื้อทางผิวหนัง (Percutaneous epididymal sperm aspiration; PESA) หรือการผ่าตัดจุลศัลยกรรมเพื่อดูดอสุจิจากท่อพักน้ำเชื้อ (Microsurgical epididymal sperm aspiration; MESA) หรือดูดอสุจิจากอัณฑะโดยตรงผ่านทางผิวหนัง (Testicular sperm aspiration; TESA) หรือการตัดชิ้นเนื้อออกมาจากอัณฑะเพื่อสกัดอสุจิ (Testicular sperm extraction; TESE) ล้วนเป็นขบวนการที่เจ็บตัว มีความเสี่ยงต่อการติดเชื้อและการเกิดภาวะแทรกซ้อน จึงควรลดจำนวนครั้งในการทำให้น้อยที่สุด ซึ่งวิธีหนึ่งก็คือการแช่แข็งอสุจิ หรือชิ้นเนื้อจากอัณฑะเก็บไว้บางส่วน(ธีระพร วุฒยวนิช, 2552)

หลักการของการแช่แข็งอสุจิคือการทำให้เซลล์สูญเสียน้ำภายในบางส่วนเพื่อลดการเกิดผลึกน้ำแข็งในระหว่างการลดอุณหภูมิลง เนื่องจากผลึกน้ำแข็งที่เกิดขึ้นอาจทำให้อสุจิตายได้ จะป้องกันได้โดยใช้ Cryoprotectant Agents (CPAs) ซึ่งเป็นสารที่ช่วยป้องกันการถูกทำลายจากกระบวนการแช่แข็งโดยมีกลไกป้องกันไม่ให้เกิดผลึกน้ำแข็งขึ้นภายในเซลล์ ได้แก่ สารโมเลกุลเล็กจำพวก Ethylene glycol, Glycol, Glycine, Glycerol และสารโมเลกุลใหญ่ประเภทน้ำตาล Sucrose, Raffinose, Trehalose และสารกลุ่มโปรตีนและLipoproteins เช่น AlbuminและEgg yolk (ไข่แดง) เป็นต้น(โอภาส เศรษฐบุตร, 2546 ; ธีระพร วุฒยวนิช, 2552) ดังนั้นชนิดและความเข้มข้นของสารป้องกันการถูกทำลายของอสุจิจึงมีความสำคัญต่อกระบวนการแช่แข็ง การใช้ Cryoprotectant ที่เหมาะสมและ

วิธีการคัดแยกอสุจิหลังการแช่แข็งจึงดูเหมือนว่าเป็นสิ่งสำคัญมากที่สุดในการป้องกันการกระจายตัวของDNAและอัตราการรอดชีวิตของอสุจิ (สมพร ชินสมบูรณ์และแอนนา วงศ์กุหลาบ, 2539)

การศึกษากระบวนการแช่แข็งและการเลือกใช้ Cryoprotectant ที่ผ่านมาเป็นการศึกษาเปรียบเทียบน้ำยาชนิดต่างๆ ในเทคนิคการแช่แข็งที่หลากหลาย มีการทดลองใช้ Cryoprotactant หลากหลายชนิดในการแช่แข็งและประเมินผลกระทบต่อคุณสมบัติต่างๆ ของอสุจิ เช่น อัตราการเคลื่อนไหว, อัตราอสุจิที่มีรูปร่างปกติ, อัตราอสุจิที่มีชีวิต, ความเสียหายของDNA , ความเสียหายของเยื้อหุ้มเซลล์ เป็นต้น โครงการวิจัยนี้ต้องการศึกษาเปรียบเทียบน้ำยาแช่แข็ง 3 ชนิด คือ 1) Glycerol egg yolk citrate(GEYC) 2) Glycerol citrate buffer(GC) และ 3) Human sperm preservation medium (HSPM) ในการแช่แข็งแบบเนื้อแก้วโดยเทคนิค Solid surface vitrification เพื่อศึกษาอัตราการเคลื่อนไหว (Motility), อัตราการเคลื่อนไหวไปข้างหน้า (Progressive motility), อัตราอสุจิที่มีรูปร่างปกติ (Normal sperm morphology) และอัตราอสุจิที่มีชีวิต (Vitality) ภายหลังการแช่แข็ง และพิจารณาว่าน้ำยาชนิดใดให้ผลการแช่แข็งอสุจิดีที่สุดและเหมาะสมสำหรับนำมาพัฒนาใช้ในงานห้องปฏิบัติการเด็กหลอดแก้ว ศูนย์รักษาผู้มีบุตรยาก โรงพยาบาลธรรมศาสตร์เฉลิมพระเกียรติ

วิธีการศึกษา

1. การเตรียมน้ำอสุจิ (Sperm preparation)

เก็บน้ำอสุจิโดยวิธีสำเร็จความใคร่ด้วยตนเอง(Masturbation) ใส่ในภาชนะพลาสติกปากกว้างที่ปราศจากเชื้อ นำน้ำอสุจิที่เก็บได้มาตรวจวิเคราะห์คุณภาพอสุจิ เพื่อประเมินคุณภาพอสุจิว่าอยู่ในเกณฑ์มาตรฐานตามเงื่อนไขโครงการวิจัย นำน้ำอสุจิที่ผ่านเกณฑ์มาตรฐานคัดแยกด้วยเทคนิค Discontinuous density gradient เพื่อใช้ในการทดลองต่อไป

2. การทดลองแช่แข็งและละลายอสุจิ

แบ่งอสุจิที่คัดแยกของอาสาสมัครแต่ละคนออกเป็น 4 กลุ่ม

1. กลุ่มอสุจิก่อนการแช่แข็ง(Pre-Freeze)

2. กลุ่มอสุจิที่แช่แข็งด้วยน้ำยา GEYC

3. กลุ่มอสุจิที่แช่แข็งด้วยน้ำยา GC

4. กลุ่มอสุจิที่แช่แข็งด้วยน้ำยา HSPM

นำอสุจิกลุ่ม2,3และ4 ทำการแช่แข็งและละลาย (Frozen-thawed) จากนั้นนำอสุจิที่ได้ไปตรวจวัดทางห้องปฏิบัติการเพื่อดูคุณสมบัติของอสุจิ ได้แก่ การเคลื่อนไหว, การเคลื่อนไหวไปข้างหน้า, รูปร่างอสุจิที่ปกติ, อสุจิที่มีชีวิต เปรียบเทียบค่าที่ตรวจวัดเช่นเดียวกันของกลุ่ม 1 (Pre-freeze)

การแช่แข็งโดยเทคนิค Solid Surface Vitrification

1. นำไนโตรเจนเหลวใส่ในกล่องโฟม

2.ใส่ถ้วยกระดาษฟอยล์ลงในกล่องโฟม ปิดฝากล่องโฟมให้อุณหภูมิของกระดาษฟอยล์ใกล้เคียงกับอุณหภูมิไนโตรเจนเหลว (-196 องศาเซลเซียส)

3. ผสมอสุจิกับน้ำยาแช่แข็งอัตราส่วน 1:1

4. ดูดส่วนผสมปริมาตร 20 ไมโครลิตร หยดลงบนกระดาษฟอยล์อย่างรวดเร็ว

5. อสุจิแช่แข็งจะมีลักษณะแข็งเป็นเม็ดกลม

6. เก็บเม็ดอสุจิแช่แข็งไว้ในCryovialแล้วนำไปแช่ในถังไนโตรเจนเหลว (-196 องศาเซลเซียส) ดังภาพที่ 1

ภาพที่ 1 แสดงการเก็บเม็ดอสุจิแช่แข็งใส่ใน Cryovial

<u>การละลายอสุจิ</u>

นำอสุจิใน Cryovial ที่แช่แข็งออกจากถังไนโตรเจนเหลวมาละลาย โดยเทเม็ดอสุจิลงบนจานพลาสติกสำหรับเลี้ยงตัวอ่อน ให้เม็ดอสุจิที่แช่แข็งวางแยกห่างกัน ทิ้งให้ละลาย 4 นาที จากนั้นใช้ Autopipette ดูดอสุจิที่ละลายแล้วใส่ในหลอดก้นกลมขนาด 5 มิลลิลิตร(ดังภาพที่ 2)แล้วนำไปตรวจวัดทางห้องปฏิบัติการ

ภาพที่ 2 แสดงการละลายเม็ดอสุจิที่แช่แข็ง

3. การตรวจคุณสมบัติภายหลังการละลาย

การประเมินค่าความเข้มข้นและการเคลื่อนไหวของอสุจิ : โดยเครื่อง Computer-aided sperm analysis (CASA)

การตรวจรูปร่างของอสุจิ : ย้อมสีอสุจิด้วยวิธี Papanicolaou stain แล้วนำไปอ่านผลภายใต้กล้องจุลทรรศน์ที่กำลังขยาย 100 เท่า เพื่อคำนวณร้อยละของตัวอสุจิที่ปกติ

การตรวจอสุจิที่มีชีวิต:โดยการทำ Hypo-osmotic swelling test (HOS-Test) ลักษณะอสุจิที่หางม้วนงอ หมายถึงอสุจิที่มีชีวิต คำนวณร้อยละของอสุจิที่มีชีวิต

4. สถิติที่ใช้ในการศึกษา

วิเคราะห์ผลการทดลองโดยโปรแกรม SPSS (Version17.0) ใช้สถิติแบบRepeated measure ที่ระดับความเชื่อมั่น 95%

ผลการศึกษา

ผลการศึกษาเปรียบเทียบค่าคุณสมบัติต่างๆระหว่างกลุ่ม Pre-freeze, กลุ่มอสุจิที่แช่แข็งด้วยน้ำยาGEYC, กลุ่มอสุจิที่แช่แข็งด้วยน้ำยาGCและกลุ่มอสุจิที่แช่แข็งด้วยน้ำยา HSPM แสดงในตารางที่1 และภาพที่ 3

ตารางที่ 1 แสดงการเปรียบเทียบคุณสมบัติของอสุจิในกลุ่มการทดลองต่างๆ

คุณสมบัติ	Pre-freeze	Thaw		
		GEYC	GC	HSPM
Motility (%) ($p < 0.05$)	86.04 ± 6.15 -	43.61 ± 17.64 (0.00)[a,c]	17.19 ± 12.08 (0.00)[a,b]	46.02 ± 17.30 (0.00)[a,c]
Progressive motility (%) ($p < 0.05$)	75.61 ± 7.08 -	37.51 ± 15.24 (0.00)[a,c]	15.44 ± 11.03 (0.00)[a,b]	39.70 ± 15.47 (0.00)[a,c]
Normal sperm morphology(%) ($p < 0.05$)	11.48 ± 4.94 -	10.06 ± 4.77 (0.006)[a], (0.00)[c]	7.14 ± 3.13 (0.00)[a,b]	7.27 ± 3.56 (0.00)[a,b]
Vitality (%) ($p < 0.05$)	88.80 ± 4.91 -	71.00 ± 8.01 (0.00)[a,c]	58.70 ± 10.32 (0.00)[a,b]	71.89 ± 11.06 (0.00)[a,c]

หมายเหตุ: ค่าเฉลี่ย ± ค่าเบี่ยงเบนมาตรฐาน

a = แตกต่างจากกลุ่มPre-Freeze อย่างมีนัยสำคัญทางสถิติที่ $p < 0.05$

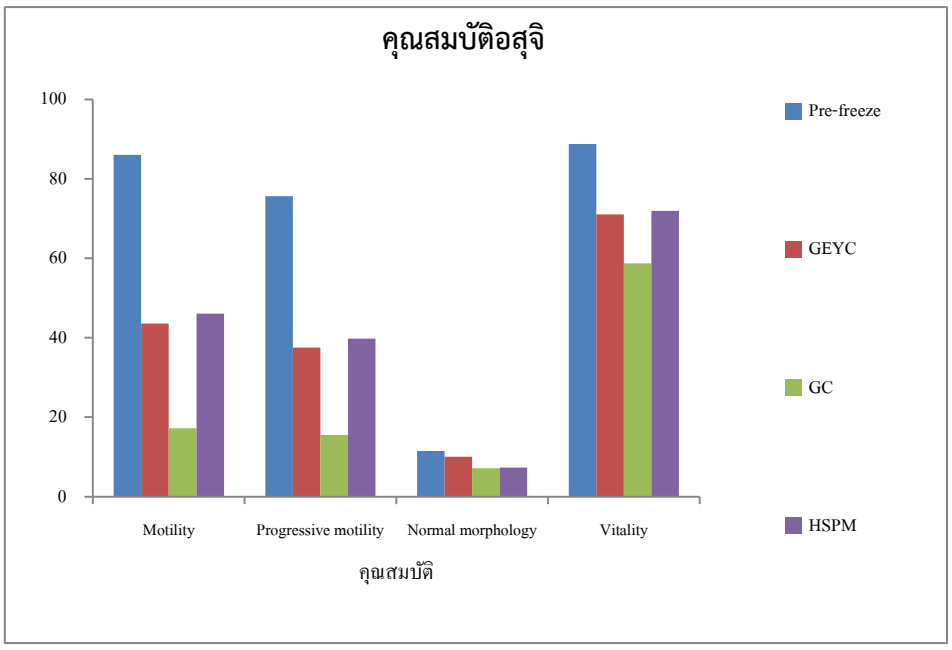
b = แตกต่างจากกลุ่ม GEYC อย่างมีนัยสำคัญทางสถิติที่ $p < 0.05$

c = แตกต่างจากกลุ่ม GC อย่างมีนัยสำคัญทางสถิติที่ $p < 0.05$

เมื่อเปรียบเทียบอัตราการเคลื่อนไหวในกลุ่มน้ำยา GEYC (43.61 ± 17.64 %), กลุ่มน้ำยาGC (17.19 ± 12.08%) และกลุ่มน้ำยา HSPM (46.02 ± 17.30%) พบว่ามีค่าลดลงอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติเมื่อเทียบกับกลุ่มPre-freeze (86.04 ± 6.15%) และเมื่อเปรียบเทียบระหว่างกลุ่มน้ำยาทั้งสามชนิดพบว่า กลุ่มน้ำยา GEYC (43.61 ± 17.64 %) กับกลุ่มน้ำยา HSPM (46.02 ± 17.30%) มีอัตราการเคลื่อนไหวสูงกว่ากลุ่มน้ำยาGC (17.19 ± 12.08%)อย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ แต่อัตราการเคลื่อนไหวอสุจิในกลุ่มน้ำยาGEYC (43.61 ± 17.64 %) กับกลุ่มน้ำยาHSPM (46.02 ± 17.30%) พบว่าไม่มีความแตกต่างกันทางสถิติ

เมื่อเปรียบเทียบอัตราการเคลื่อนไหวไปข้างหน้าในกลุ่มน้ำยา GEYC (37.51 ± 15.24%), กลุ่มน้ำยา GC (15.44 ± 11.03%) และกลุ่มน้ำยา HSPM (39.70 ± 15.47%) มีค่าลดลงอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติเมื่อเทียบกับกลุ่ม Pre-freeze(75.61 ± 7.08%)

และเมื่อเปรียบเทียบอัตราการเคลื่อนไหวไปข้างหน้าระหว่างกลุ่มน้ำยาทั้งสามชนิดพบว่า กลุ่มน้ำยา GEYC (37.51 ± 15.24%) กับกลุ่มน้ำยา HSPM (39.70 ± 15.47%)มีอัตราการเคลื่อนไหวไปข้างหน้าสูงกว่ากลุ่มน้ำยา GC (15.44 ± 11.03%)อย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ แต่เมื่อเปรียบเทียบอัตราการเคลื่อนไหวไปข้างหน้าในกลุ่มน้ำยา GEYC (37.51 ± 15.24%) กับกลุ่มน้ำยา HSPM (39.70 ± 15.47%) พบว่าไม่มีความแตกต่างกันทางสถิติ



ภาพที่ 3 แสดงเปรียบเทียบคุณสมบัติของอสุจิในกลุ่มการทดลองต่าง ๆ

เมื่อเปรียบเทียบอัตราอสุจิที่มีรูปร่างปกติในกลุ่มน้ำยา GEYC (10.06 ± 4.77%), กลุ่มน้ำยา GC (7.14 ± 3.13%) และกลุ่มน้ำยา HSPM (7.27 ± 3.56%) มีค่าลดลงอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติเมื่อเทียบกับกลุ่มPre-freeze (11.48 ± 4.94%)ในส่วนของกลุ่มน้ำยาGEYC (10.06 ± 4.77%) มีอัตราอสุจิที่มีรูปร่างปกติสูงกว่ากลุ่มน้ำยา GC (7.14 ± 3.13%) และกลุ่มน้ำยา HSPM (7.27 ± 3.56%)อย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ แต่เมื่อเปรียบเทียบอัตราอสุจิที่มีรูปร่างปกติระหว่างกลุ่มน้ำยา GC (7.14 ± 3.13%) กับกลุ่มน้ำยา HSPM (7.27 ± 3.56%) พบว่าไม่มีความแตกต่างกันทางสถิติ

เมื่อเปรียบเทียบอัตราอสุจิที่มีชีวิตในกลุ่มน้ำยา GEYC (71.00 ± 8.01%), กลุ่มน้ำยา GC (58.70 ± 10.32%) และกลุ่มน้ำยา HSPM (71.89 ± 11.06%) มีลดลงอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติเมื่อเทียบกับกลุ่มPre-freeze (88.80 ± 4.91%) และเมื่อเปรียบเทียบอัตราการอสุจิที่มีชีวิตระหว่างกลุ่มน้ำยาทั้งสามชนิดพบว่า กลุ่มน้ำยา GEYC (71.00 ± 8.01%) และกลุ่มน้ำยา HSPM (71.89 ± 11.06%) มีค่าอัตราอสุจิที่มีชีวิตสูงกว่ากลุ่มน้ำยาGC (58.70 ± 10.32%) อย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ แต่เมื่อเปรียบเทียบอัตราอสุจิที่มีชีวิตระหว่างกลุ่มน้ำยา GEYC (71.00 ± 8.01%) กับกลุ่มน้ำยา HSPM (71.89 ± 11.06%) พบว่าไม่มีความแตกต่างกันทางสถิติ

อภิปรายและสรุปผล

การแช่แข็งอสุจิเป็นกระบวนการที่เกิดอันตรายต่อการเปลี่ยนแปลงโครงสร้างของอสุจิและการทำงานของอสุจิ (Satirapod et al, 2011) ทั้งในเทคนิคการแช่แข็งแบบช้า, แบบเหนือไอไนโตรเจน หรือการแช่แข็งแบบเนื้อแก้ว (Said et al, 2010) ล้วนแล้วแต่ทำให้เซลล์ได้รับผลกระทบทางกายภาพและเคมี ส่งผลให้เกิดการเปลี่ยนแปลงขององค์ประกอบไขมันของเยื่อหุ้มอสุจิ, การเคลื่อนไหวของอสุจิ, อัตราการมีชีวิตและการเปลี่ยนแปลงของ Acrosome (O'Connell et al., 2002; Alvarez & Storey,1993; Schiller et al., 2000 ; Hammadeh et al., 1999) ดังนั้นการใช้อสุจิที่ผ่านการแช่แข็งจึงมีผลต่อประสิทธิภาพในการปฏิสนธิ (Brotherton, 1990; Oehninger et al., 2000; Aitken, 1995)

กลไกการถูกทำลายของอสุจิมีหลายปัจจัย (Avery, 1999; Alvarez& Storey, 1993; Aitken, 1995) ความเสียหายของเซลล์สามารถเกิดขึ้นได้ในระหว่างกระบวนการแช่แข็งและละลาย เช่น การเกิด Thermal shock, การเกิด Intracellular ice crystals, การเกิด Cellular dehydration, ความเข้มข้นของเกลือลดลง, การเกิด Oxidative stress และการเกิด Osmotic shock เป็นต้น (Juan & Martínez , 2011) ความความสำเร็จในกระบวนการแช่แข็งจึงขึ้นกับปัจจัยหลายอย่างไม่ว่าจะเป็น การเลือกใช้ Cyoprotectant, การเลือกเทคนิคการแช่แข็ง, ปริมาณตัวอย่างในการแช่แข็งและอุณหภูมิในขั้นตอนการละลาย (Avery, 1999; Kiran et al., 2004)

การแช่แข็งแบบเนื้อแก้วเป็นเทคนิคที่พัฒนาเพื่อลดความเสี่ยงในการถูกทำลายของเซลล์จากกระบวนการแช่แข็ง เช่น หลีกเลี่ยงการเกิด Chilling injury อันเป็นอันตรายที่เกิดกับเซลล์ในกระบวนการแช่แข็งที่อุณหภูมิสูงกว่า 0 องศาเซลเซียสโดยการลดอุณหภูมิลงในเวลาที่รวดเร็วเป็นวินาที และหลีกเลี่ยงการเกิดผลึกน้ำแข็งภายในเซลล์โดยการเปลี่ยนสารละลาย

ภายในเซลล์ให้เป็นของแข็งคล้ายแก้ว (ธีระพร วุฒยวนิช, 2552; Vajta & Nagy, 2006; Degg, 2005) ปัจจุบันการแช่แข็งแบบเนื้อแก้วกลายเป็นเทคนิคที่ใช้กันทั่วไปในการแช่แข็งเซลล์ไข่และตัวอ่อน ทำให้การพัฒนาเทคนิคการแช่แข็งอสุจิแบบเนื้อแก้วเป็นองค์ความรู้ที่น่าสนใจ(Sharma et al, 2015) ในการศึกษานี้จึงเลือกใช้การแช่แข็งแบบเนื้อแก้ว โดยเทคนิค Solid surface vitrification เพื่อศึกษาเปรียบเทียบน้ำยาแช่แข็งอสุจิ

จากการแช่แข็งอสุจิในน้ำยา 3 ชนิด (GEYC, GC และ HSPM) พบว่าอัตราการเคลื่อนไหวและอัตราการเคลื่อนไหวไปข้างหน้าของอสุจิลดลงเมื่อเปรียบเทียบกับกลุ่มPre-freeze สอดคล้องกับหลายงานการศึกษา(Patrik et al., 1999; Hallak et al., 2000; McGonagle et al., 2002; Kiran et al., 2004; Paras et al., 2007 ; Centola et al., 1992; Bhattacharya et al, 2006; Zhang et al., 2012; จิรัฐติกาล ไชยา, 2556; เกศนิษา นรสิงห์, 2557) ที่พบว่าอสุจิที่ผ่านกระบวนการแช่แข็งจะมีการเปลี่ยนแปลงอัตราการเคลื่อนไหวของอสุจิซึ่งเป็นคุณสมบัติหนึ่งของอสุจิที่ได้รับผลกระทบมากที่สุด (Sharma et al., 2015) อัตราการเคลื่อนไหวที่ลดลงของอสุจิเป็นเพราะความเสียหายทางกายภาพของหางจากการเปลี่ยนแปลงของ Mitochondria ความเสียหายของเยื้อหุ้ม Mitochondria จะส่งผลในกระบวนการผลิตพลังงานซึ่งนำไปสู่ความสามารถที่ลดลงของการถ่ายโอน ATP ของอสุจิ ดังนั้นกระบวนการแช่แข็งอาจเกิดการขดม้วน (Colling) ของหางซึ่งมีผลต่อการอัตราการเคลื่อนไหว (O'Connell et al., 2002)

เมื่อเปรียบเทียบระหว่างกลุ่มน้ำยาที่แช่แข็งอสุจิ 3 ชนิด พบว่ากลุ่มน้ำยา GEYC กับกลุ่ม น้ำยา HSPM มีอัตราการเคลื่อนไหวและอัตราการเคลื่อนไหวไปข้างหน้าสูงกว่ากลุ่มน้ำยา GC อย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ สอดคล้องกับการศึกษาของ Hallakและคณะ (2000)ที่เปรียบเทียบการแช่แข็งในน้ำยา TYG (มีส่วนผสมของ Egg yolkและ Glycerol เช่นเดียวกับน้ำยา GEYC ในการศึกษานี้) และ Glycerol เพียงอย่างเดียว ซึ่งพบว่าการแช่แข็งในน้ำยา TYG ทำให้อัตราการเคลื่อนไหว, อัตราอสุจิที่มีรูปร่างปกติและความสมบูรณ์ของเยื้อหุ้มเซลล์อสุจิดีกว่าการแช่แข็งใน Glycerol เพียงอย่างเดียว เช่นเดียวกับการศึกษาของ McGonagle และคณะ(2002)ที่พบว่าอัตราการเคลื่อนไหวของอสุจิภายหลังการแช่แข็งในน้ำยา Egg yolk-citrate-glucose-glycerol และ Egg yolk-tris-glucose-glycerol ดีกว่าการใช้ Glycerol เพียงอย่างเดียว

ในหลายๆการศึกษาได้ข้อสรุปที่ตรงกันว่าการใช้ Cryoprotectant ชนิดเดียวในการแช่แข็งทำให้คุณภาพอสุจิต่ำกว่าการใช้ Cryoprotectant แบบผสมอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ (Gao et al., 1995; Hammitt et al., 1998; Jeyendran et al., 1984; Ragni et al, 1993; Smith et al., 1987; Holmgren et al., 1989) นอกจากนี้ยังพบว่าการใช้น้ำยา TYB ผสมกับ Glycerol ยังให้ผลอัตราการฟื้นสภาพการเคลื่อนไหว (Cryosurvival) ดีกว่าการใช้ Glycerol เพียงอย่างเดียว (Jeyendran et al., 1984) อาจสรุปได้อัตราการเคลื่อนไหวและอัตราการเคลื่อนไหวไปข้างหน้าของการแช่แข็งในกลุ่มน้ำยา GC ที่ต่ำกว่าเป็นผลของ toxicity damage ของ Glycerol เนื่องจากมีปริมาณความเข้มข้นของ Glycerol (Glycerol 20%) สูงกว่าในน้ำยา HSPM (Glycerol 15%) และ GEYC (Glycerol 10%) นอกจากนี้ยังพบว่า

ความเข้มข้นที่สูงของGlycerol จะทำให้เซลล์อสุจิเกิดความเสียหายจาก Osmotic injury ในขณะทำการละลาย (Gao et al., 1995) ในการลด Toxic ของ Glycerol จึงมีการแนะนำให้ใช้ในปริมาณความเข้มข้นต่ำ, การผสมกับอสุจิกับน้ำยาแช่แข็งที่อุณหภูมิต่ำหรือทำให้เจือจางอย่างรวดเร็วในขั้นตอนการละลาย (Juan & Martínez , 2011; Clarke et al., 2004; Vutyavanic et al., 2009) ซึ่งความเข้มข้นที่เหมาะสมของ Glycerol สำหรับการแช่แข็งอสุจิของคนอยู่ระหว่าง 2% - 10% (Mahadevan & Trounson, 1983) การใช้ Glycerol ความเข้มข้นที่ต่ำและการขจัด Glycerol อย่างรวดเร็วอาจเพิ่มช่วงอัตราการฟื้นสภาพการเคลื่อนไหว (Cryosurvival)หลังการละลายได้ (Hallak et al., 2000)

ในการเปรียบเทียบระหว่างกลุ่มน้ำยา GEYC กับกลุ่มน้ำยา HSPM พบว่าอัตราการเคลื่อนไหวและอัตราการเคลื่อนไหวไปข้างหน้าของอสุจิไม่มีความแตกต่างกันทางสถิติ สอดคล้องกับงานของ Bhattacharyaและคณะ (2006)ที่พบว่าอัตราการเคลื่อนไหวภายหลังการแช่แข็งอสุจิในน้ำยา TYB (มีส่วนประกอบของ Egg yolk เช่นเดียวกับ น้ำยา GEYC) และน้ำยา HSPM มีค่าไม่แตกต่างกัน

แต่ทั้งนี้กลับพบว่ามีหลายๆการศึกษาที่ให้ผลแตกต่างจากการศึกษาในครั้งนี้ เช่น การศึกษาของ Centola และคณะ(1992)ให้ผลการแช่แข็งในน้ำยา HSPM มีการฟื้นคืนสู่สภาพปกติ(recovery) ที่ดีกว่าน้ำยาTYB และ glycerol เพียงอย่างเดียว โดยอัตราการเคลื่อนที่, อัตราความเร็ว(velocity) และอัตราการฟื้นคืนสู่สภาพปกติแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ

และอีกหลายๆการศึกษาที่พบว่าการแช่แข็งในน้ำยา TYB หรือในน้ำยา GEYC ให้ผลอัตราการเคลื่อนไหวดีกว่าการแช่แข็งในน้ำยา HSPM (Stanic et al., 1999; Hallak et al., 2000; McGonagle et al., 2002; Kiran et al., 2004; Paras et al., 2007) ซึ่งพบว่าเป็นผลจากการใช้ Egg yolk เป็นส่วนประกอบในน้ำยา TYB หรือน้ำยา GEYC สำหรับกลไกการทำหน้าที่ของน้ำยา TYB ยังไม่มีความชัดเจน แต่อาจด้วยส่วนประอบของ Egg yolk ที่มี Cholesterol, Phospholipid และสารต้านอนุมูลอิสระ รวมถึงส่วนประกอบต่างๆที่สำคัญของน้ำยา TYB (Paras et al., 2007) มีการศึกษาว่าการเติม Egg yolk ในน้ำยาแช่แข็งอสุจิเป็นตัวช่วยป้องกันความเสียหายของอสุจิจากการเกิด Osmotic shock (Hammadeh et al., 2001) ทั้งนี้อาจมีการแลกเปลี่ยนไขมันของเยื่อหุ้มอสุจิและPhospholipid หรืออาจเป็นกลไกระหว่างโมเลกุลขนาดใหญ่ของ Egg yolk และโปรตีนในพลาสมาของอสุจิและส่วนประกอบต่างๆในน้ำยาTYB (Jeyendran et al., 1984) ทำให้การแช่แข็งที่มี Egg yolk เพิ่มเสถียรภาพการทำงานของเอนไซม์ที่เยื้อหุ้มเซลล์(Acrosin, Proacrosin) (Kiran et al. , 2004; Hallak et al., 2000)

อาจสรุปได้ว่าความแตกต่างของผลการศึกษาที่ผ่านมารวมถึงการศึกษาในครั้งนี้เกิดจากการเลือกใช้เทคนิคการแช่แข็งที่แตกต่างกันตลอดจนขั้นตอนการละลายที่แตกต่างกันย่อมส่งผลต่อคุณสมบัติของอสุจิหลังการแช่แข็งที่แตกต่างแม้ว่าจะมีการใช้น้ำยาแช่แข็งที่เหมือนกันก็ตาม

นอกจากนี้ยังพบว่ากระบวนการแช่แข็งในน้ำยาทั้ง 3 ชนิด ทำให้อัตราอสุจิที่มีรูปร่างปกติลดลงเมื่อเทียบกับกลุ่ม Pre-freeze

สอดคล้องกับหลายการศึกษา(Tongdee et al., 2015; Kiran et al., 200; Bhattacharya et al., 2006; Hammadeh et al., 2001) ที่พบว่าการแช่แข็งส่งผลให้อสุจิที่มีรูปร่างปกติลดลงอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ในการเปรียบเทียบระหว่างกลุ่มน้ำยาพบว่าการแช่แข็งในกลุ่มน้ำยา GEYC ให้อัตราอสุจิที่มีรูปร่างปกติภายหลังการละลายสูงกว่ากลุ่มน้ำยา GC และ HSPM สอดคล้องการศึกษาของ Hammadeh และคณะ(2001)ในการใช้ น้ำยา TYB เปรียบเทียบกับน้ำยา HSPM ที่พบว่าน้ำยาTYB ช่วยป้องกันความเสียหายของโครมาตินและการเปลี่ยนแปลงรูปร่างของอสุจิได้ดีกว่าทั้งในน้ำอสุจิปกติและผิดปกติ และการศึกษาของ Hallakและคณะ(2000)ในการเปรียบเทียบน้ำยาTYG และ Glycerol เพียงอย่างเดียว พบว่าการแช่แข็งในน้ำยาTYG ทำให้อัตราอสุจิที่มีรูปร่างปกติและความสมบูรณ์ของเยื้อหุ้มเซลล์อสุจิดีกว่าการแช่แข็งใน Glycerol เพียงอย่างเดียว นอกจากนี้ยังสอดคล้องกับการศึกษาของจิรัฐติกาล ไชยา(2556) ที่พบว่าการแช่แข็งแบบเนื้อแก้ว ในน้ำยา GEYC ให้ผลอัตรารูปร่างอสุจิที่ปกติสูงกว่าการแช่เหนือไอไนโตรเจนในน้ำยา HSPM การศึกษาของ Paulson และคณะ (1992) ทดลองใช้น้ำยา TYB ปรับสภาพของอสุจิของกลุ่มผู้ชายภาวะมีบุตรยาก เป็นเวลา 24 ชั่วโมง ก่อนการทำ In vitro fertilization(IVF) พบว่าช่วยเพิ่มอัตราการปฏิสนธิมากขึ้น นอกจากนี้ยังพบว่าการบ่มอสุจิของหนูแฮมสเตอร์ในน้ำยา TYB สามารถช่วยเพิ่มความสามารถในการปฏิสนธิและการตั้งครรภ์จากการผสมเทียมได้ (Ragni et al., 1993)

และจากการศึกษาของ Guruprasad และคณะ (2008) พบว่าระหว่างกระบวนการแช่แข็งและละลาย จะเกิดความเสียหายของ DNA เพิ่มขึ้นสามเท่าในกลุ่มอสุจิรูปร่างของหัวผิดปกติ (Teratospermia) เมื่อเทียบกับกลุ่มอสุจิปกติ (Normospermia) แสดงให้เห็นว่าอสุจิที่ผิดปกติมีแนวโน้มเกิดความเสียหายของ DNA และการปรับเปลี่ยนโครงสร้างโครมาตินระหว่างกระบวนการแช่แข็งสูงกว่าอสุจิที่มีรูปร่างปกติ กล่าวได้ว่าการเปลี่ยนแปลงรูปร่างของอสุจิสัมพันธ์กับความเสียหายของ DNA ดังนั้นการใช้ Egg yolk ร่วมกับ Glycerol จึงน่าจะมีประสิทธิภาพที่ดีในการป้องกันอสุจิจากผลกระทบของกระบวนการแช่แข็ง

ข้อเสนอแนะ

จากการทดลองแสดงให้เห็นว่าการแช่แข็งในน้ำยา GEYC และ HSPM ให้อัตราการเคลื่อนไหว, อัตราการเคลื่อนไหวไปข้างหน้าและอัตราอสุจิที่มีชีวิตดีกว่าน้ำยา GC เพราะมีปริมาณความเข้มข้นของ Glycerol ที่ต่ำกว่า (GEYC, HSPM, GC: 10%, 15%, 20% Glycerol ตามลำดับ) แต่ไม่พบความแตกต่างระหว่างการแช่แข็งในน้ำยาทั้งสองชนิด และการใช้ Egg yolk เป็นส่วนประกอบในน้ำยาแช่แข็ง (GEYC) ให้อัตราอสุจิที่มีรูปร่างปกติดีที่สุด กล่าวได้ว่าน้ำยา GEYC และ HSPM เหมาะสมสำหรับการแช่แข็งแบบเนื้อแก้วโดยเทคนิค Solid surface vitrification

การแช่แข็งอสุจิในกลุ่มผู้ชายภาวะมีบุตรยาก (subfertile men) กลุ่มผู้ชายที่มีจำนวนอสุจิและการเคลื่อนไหวต่ำ (oligoasthenozoo-spermia) หรือกลุ่มที่มีรูปร่างอสุจิผิดปกติ (Teratospermia) ซึ่งมีแนวโน้มเกิดความเสียหายของ DNA และการปรับเปลี่ยนโครงสร้างโครมาตินระหว่างกระบวนการแช่แข็งสูงกว่ากลุ่มผู้ชายที่มีรูปร่าง

อสุจิปกติ ควรใช้น้ำยา GEYC หรือน้ำยาที่มีส่วนผสมของ Egg yolk ในการศึกษาต่อไป เพื่อนำไปพัฒนาและประยุกต์ใช้กับเทคโนโลยีช่วยการเจริญพันธุ์ได้

กิตติกรรมประกาศ

การศึกษาวิจัยหัวข้อ “การศึกษาเปรียบเทียบการแช่แข็งแบบเนื้อแก้วโดยเทคนิค Solid surface vitrification ในน้ำยาแช่แข็งอสุจิ 3 ชนิด 1) Glycerol egg yolk citrate 2) Glycerol citrate buffer และ 3) Human sperm preservation medium” สำเร็จลุล่วงด้วยความอนุเคราะห์ของรองศาสตราจารย์นายแพทย์พฤหัส ต่ออุดม สำหรับการให้คำแนะนำ ชี้แนะแนวทางในการจัดทำโครงการวิจัยนี้ ผู้วิจัยจึงขอขอบพระคุณเป็นอย่างสูงไว้ ณ ที่นี้

การวิจัยครั้งนี้ได้รับทุนสนับสนุนการวิจัยจากโรงพยาบาลธรรมศาสตร์เฉลิมพระเกียรติปีงบประมาณ 2558

เอกสารอ้างอิง

เกศนิษา นรสิงห์. (2557). *ผลของการเติมโคเอนไซม์คิวเทนในน้ำยาแช่แข็งต่อคุณภาพและการแตกหักของสายดีเอ็นเอในอสุจิที่ผ่านกระบวนการแช่แข็งแบบเนื้อแก้วในชายที่มีอสุจิปกติ.* มหาวิทยาลัยธรรมศาสตร์. ปทุมธานี.

เจริญไชย เจียมจรรยา. (2554). *ภาวะมีบุตรยากและการช่วยการเจริญพันธุ์.* กรุงเทพฯ : คณะแพทย์ศาสตร์ มหาวิทยาลัยธรรมศาสตร์. น. 403-405.

จิรัฐติกาล ไชยา. (2556). *การศึกษาเปรียบเทียบการแช่แข็งอสุจิแบบเนื้อแก้วโดยเทคนิค Solid surface vitrification และการแช่เหนือไอไนโตรเจน(Vapor Freezing).* โครงการวิจัยเพื่อพัฒนางานโรงพยาบาลธรรมศาสตร์เฉลิมพระเกียรติ.

ธีระพร วุฒยวนิช. (2552). *การแช่แข็งแบบเนื้อแก้ว*. เชียงใหม่ : บริษัท สันติภาพแพ็คพริ้นท์ จำกัด.

สมพร ชินสมบูรณ์และแอนนา วงศ์กุหลาบ. (2539). *สรีรวิทยาของอสุจิ.* ใน:อร่าม โรจนสกุลและสมพร ชินสมบูรณ์, บรรณาธิการ. การปฏิสนธินอกร่างกายทางคลินิก. กรุงเทพมหานคร: ข้าวฟ่าง. น.37-48

โอภาส เศรษฐบุตร. การแช่แข็งตัวอสุจิ. (2546)ใน: ธีรพร วุฒยวนิช,บรรณาธิการ. เทคโนโลยี ช่วยการเจริญพันธุ์. เชียงใหม่: นพบุรีการพิมพ์.

Aitken, R.J.(1995). Free radicals, lipid peroxidation and sperm function. *Reprod Fertil, 7*(4), 659–668.

Anger, J.T., Gilbert, B.R., Goldstein, M. (2003). Cryopreservatiom of sperm: indication, methods and results. *J Urology, 170*(4), 1079-1084.

Alvarez, J.G., Storey, B.T. (1993). Evidence that membrane stress

contributes more than lipid peroxidation to sublethal cryodamage in cryopreserved human sperm: glycerol and other polyols as sole cryoprotectant. *J Androl, 14*(3), 199–209.

Avery, R.M.(1999). Laboratory techniques : sperm preparation for assisted conception. In Brinsden PR, editor. *A textbook of in vitro fertilization and assisted reproduction*. New York : Parthenon Publishing Group. 203-209.

Baumann, K.H., Weidner, A., Kalff-Suske, M, Bock K. (2007). Assisted reproduction using cryopreserved sperm – a mini review. *J Reprod Endo, 4*(2), 97–100.

Bhattacharya, J., et al. (2006). *A comparative study on TEST-Yolk buffer and human sperm preservation medium on post thaw characteristics of human sperm from pre-freeze specimens. Oasis*, The Online Abstract Submission System.

Brotherton, J. (1990). Cryopreser-vation of human semen. Arch. *Androl, 25*(2), 181–195.

Centola, G.M., et al. (1992). Cryopre-servation of human semen: Comparison of cryopreservatives, sources of variability and prediction of post-thaw survival. *J. Androl, 13*(3), 283-288.

Clarke, G., Liu, D., Baker, H. (2004). Improved sperm cryopreservation using cold cryoprotectant. *Reprod Fertil, 15*(7),377–381

Degg, D.E. (2005). The role of vitrification techniques of cryopreservation in reproductive medicine. *Hum Fertil, 8*(4), 231-239

Donnelly, E.T., Mcclure, N., Lewis, E.M. (2001). Cryopreservation of human semen and prepared sperm: effects on motility parameter and DNA integrity. *Fertil Steril, 76*(5), 892-900.

Gao, D.Y., et al. (1995). Prevention of osmotic injury to human spermatozoa during addition and removal of glycerol. *Hum Reprod, 10*(5), 1109-1122.

Guruprasad, K., et al. (2008). Effect of cryopreservation on sperm DNA integrity in patients with teratospermia. *Fertil Steril, 89*(6), 1723-1727.

Hammadeh, M.E., Rosenbaum, W., Schmidt. (1999). Effect of freeze–thawing procedure on chromatin stability, morphological alteration and membrane integrity of human

spermatozoa in fertile and subfertile men. Int. *J. Androl, 22*(3), 155–162.

Hammitt, D.G., Walker, D.L., Williamson, R.A. (1998). Concentration of glycerol required for optimal survival and in vitro fertilizing capacity of frozen sperm is dependent on cryopreservation medium. *Fertil Steril, 49*(4), 680-687.

Hallak, J., et al. (2000). Cryopre-servation of human spermatozoa: comparison of TEST- yolk buffer and glycerol. *Int J Fertil, 45*(1), 38-42.

Holmgren, W.J., et al. (1989). Preincu-bation of human spermatozoa in TEST-yolk medium: effect on penetration of zona-free hamster oocytes and correlation with other semen characteristics. *J In Vitro Fertil Embr Transfr, 6*(4), 207-212.

Jeyendran, R.S., et al. (1984). Compa- rison of glycerol and a zwitterion buffer system as cryoprotective media for human spermatozoa. Effect on motility, penetration of zona-free hamster oocytes, and acrosin/proacrosin. *J Androl, 5*(1), 1-7.

Jensen, J.R., Morbeck, D.E., Cod-dington, C.C. (2011). Fertility preservation. *Mayo Clinic Proceeding, 86*(1), 45-49.

Juan, C., Martínez, S. (2011). Assessment of

two thawing processes of cryopreserved human sperm in pellets. *Cryobiology, 63*(3), 131-136.

Kiran, P., et al. (2004). Cryopreser-vation of human spermatozoa: Comparison of two cryopreservation methods and three cryoprotectants. *Fertil Steril, 82*(4), 913-918.

Mahadevan, M., Trounson, A.O., (1983). Effect of cryoprotective media and dilution methods on the preservation of human spermatozoa. *Andrologia , 15*(4), 355-366.

McGonagle, L.S., et al. (2002) The influence of cryoprotective media and processing procedures on motility and migration of frozen-thawedhuman sperm. *Asian J Androl, 4*(2), 137-41.

Oehninger, S., et al. (2000).Assessment of sperm cryodamage and strategies to improve outcome Mol. Cell. *Endocrinol, 169*(1-2), 3–10.

O'Connell, M., McClure, N., Lewis, S. (2002). The effects of cryopreservation on sperm

morphology, motility and mitochon-

drial function. *Hum. Reprod., 17*(3), 704–709.

Ragni , G., et al. (1993). Enhanced quality of capacitated spermatozoa from oligoastheno- zoospermic men after incubation in Test yolk medium. *Andrologia, 25*(6), 337-339.

Sanger, W.G., et al. (1992). Semen cryobanking for men with cancer Criteria change. *Fertil Steril, 58*(5), 1024-1027.

Satirapod C., et al. (2011). Compari-son of cryopreserved human sper m from solid surface vitrification and standard vapor freezing method: on motility, morphology, vitality and DNA integrity. *J andrology, 44*(1), 786-790.

Said, T.M., et al. (2010). Implication of apoptosis in sperm cryoinjury. *Reprod Biomed Online, 21*(4), 456-62.

Schiller, J., et al. (2000). Lipid analysis of human spermatozoa and seminal plasma by MALDI-TOF mass spectrometry and NMR spectroscopy – effects of freezing and thawing. Chem. *Phys. Lipids, 106*(20, 145–156.

Smith, R.G., et al. (1987). Functional tests of spermatozoa-sperm penetration assay. *Urol Clin North Am1, 4*(3), 451-458.

Sharma, R., et al. (2015). Effect of sperm storage and selection techniques on sperm parameters *Syst Biol Reprod Med, 61*(1), 1-12.

Tongdee, P., et al. (2015). Compari-son of Cryopreserved Human Sperm between Ultra Rapid Freezing and Slow Programmable Freezing: Effect on Motility, Morphology and DNA Integrity. *J Med Assoc Thai, 98* (4), 33-42.

Vajta, G., Kuwayama, M., Vanderzwalmen, P. (2007). Disadvantages and benefits of vitrification. *informa UK Ltd*, 33-34.

Stanic, P., et al. (1999). Comparison of protective media and freezing techniques for cryopreservation of human semen. *Reprod Biology, 91*(1), 65-70.

Paulson, R.J., et al. (1992). Prospective controlled evaluation of TEST-yolk buffer in the preparation of sperm for human in vitro fertilization in suspected cases of male infertility. *Fertil Steril, 58*(3), 551–555.

Paras, L., et al. (2007). Cryopreser-vation technique: comparison of Test yolk buffer versus SpermCryo and vapour versus computerised freezing. *J Andrology, 40*(1), 18-22.

Vutyavanic T, et al. (2009). Closed-system solid surface vitrification versus slow programmable freezing of mouse 2-cell embryos. *J Assist Reprod Genet*, 26(5), 285–290.

Zhang X., et al. (2012). Effect of pre-freezing conditions on the progressive motility recovery rate of human frozen spermatozoa. *Andrologia, 44*(5), 343-348.